

Vimentin 在原发性肝癌发生发展及凋亡过程中的作用

谢金玲,卓少元

(广西中医药大学基础医学院,广西 南宁 530200)

摘要: Vimentin(波形蛋白)是主要存在于间充质细胞中的一种中间纤维蛋白,近年研究表明 Vimentin 在肝癌等众多上皮来源的恶性肿瘤细胞中过度表达。Vimentin 可能是肝癌细胞内一种重要的信号分子,可通过与肝癌致病因子直接相互作用、调控上皮-间质转化(EMT)过程和抑制 NLRP3/Caspase-1 炎症信号而在肝癌发生发展过程中发挥重要作用;此外,Vimentin 还参与 Caspase 介导的肝癌细胞凋亡。因此,进行 Vimentin 的研究和干预对肝癌的治疗具有十分重要的意义。全文就 Vimentin 在原发性肝癌发生发展及凋亡过程中的作用作一简要综述。

关键词: Vimentin;原发性肝癌;发生发展;凋亡

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2017)02-0130-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2017.02.A011

Role of Vimentin in Progression and Apoptosis of Primary Liver Cancer

XIE Jin-ling, ZHUO Shao-yuan

(School of Basic Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: Vimentin is a major intermediate filament (IF) protein of mesenchymal cells. Recent studies have shown overexpression of vimentin in epithelial-derived cancer cells, including liver cancer. Vimentin is an important signal molecule in development and progression of liver cancer cells, which participates in epithelial-mesenchymal transition and inhibits activation of NLRP3/Caspase 1 pathway through direct interaction with hepatocarcinogenic factors. Furthermore, vimentin is also involved in caspase-mediated apoptosis of liver cancer cells. The roles of vimentin in progression and apoptosis of primary liver cancer are reviewed in this article.

Key words: Vimentin; primary liver cancer; development and progression; apoptosis

Vimentin(波形蛋白)是中间纤维(intermediate filaments, IF)的主要组成部分,广泛表达于各种正常的间质细胞及中胚层来源的细胞,其一端与核膜相连,另一端与细胞表面处的桥粒或半桥粒相连,将细胞核和细胞器维持在特定的空间,可以通过组装成纤维和解聚为非纤维性颗粒(nonfilamentous particles)参与细胞内的信号调节。Vimentin 在上皮细胞中的表达是细胞发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的主要特征之一,其阳性表达也提示肿瘤细胞发生了 EMT^[1]。已证实 Vimentin

在众多上皮来源的恶性肿瘤组织或癌细胞株中(如肝癌、肺癌等)过度表达,并作为一种重要的信号分子和转录因子,参与肿瘤细胞的快速生长、浸润、转移^[2]及凋亡^[3,4]。因此,进行 Vimentin 的研究和干预对肿瘤的治疗具有十分重要的意义。本文就 Vimentin 在原发性肝癌发生发展及凋亡过程中的作用作一简要综述。

1 Vimentin 是联系“炎癌转化”的重要分子

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC; 以下简

收稿日期:2016-03-29;修回日期:2016-07-27

基金项目:广西自然科学基金(2014GXNSFBA118145)

通讯作者:卓少元, E-mail: sherwin_zhuo@126.com

称肝癌)是临床常见难治的恶性肿瘤,在各种恶性肿瘤中发病居第3位、死亡居第2位^[5]。流行病学研究证实,传染性病原体(如嗜肝病毒)或有毒化合物(如酒精)触发的慢性肝脏炎症在肝癌的发生发展过程中具有至关重要的促进作用^[6,7]。据世界卫生组织(WHO)统计,发展中国家肝癌患者中有乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的约占60%,有丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的占33%;此外,在亚洲和非洲部分地区,黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)暴露也是肝癌发生的重要因素^[8]。持续性的炎症会使机体处于长期的慢性肝病状态,可能造成肝细胞基因表达、形态结构、周围微环境等异常,最终导致肝癌的发生与发展^[6]。众多研究表明,Vimentin在“炎癌转化”过程具有非常重要的作用。

1.1 Vimentin 可与肝癌致病因子直接相互作用

在肝癌各种致病因子中,以HCV与Vimentin关系的研究较为清楚。Kang等^[9]利用蛋白质组学技术观察到HCV核心蛋白在体内能够与Vimentin相互作用。Nitahara-Kasahara等^[10]发现HCV核心蛋白在Uc39-6细胞(来源于人肝癌细胞株Huh7,可表达HCV核心蛋白)的表达水平受细胞内Vimentin含量的影响,当敲除Vim基因后,虽然HCV核心蛋白mRNA水平没有明显变化,但其蛋白质发生蛋白酶体依赖的降解,含量显著降低。而Liu等^[11]利用携带HCV核心蛋白基因的腺病毒体外转染L02肝细胞和HepG2肝癌细胞,证实HCV核心蛋白可通过上调Vimentin、snail、snail2等间质蛋白表达,诱导L02肝细胞和HepG2肝癌细胞发生EMT,刺激细胞增殖,抑制细胞凋亡,增加细胞迁移;且过度表达HCV核心蛋白的L02细胞能在裸鼠体内形成肿瘤。当采用siRNA敲除Vim基因后,可使肝癌细胞^[12]、乳腺癌细胞^[1]等的迁移能力明显减弱。

1.2 Vimentin 可通过 EMT 调节“炎癌转化”

近年来,越来越多的研究表明,EMT作为链接“炎癌转化”的重要纽带,在促进肝癌发生及肝癌细胞浸润和转移等方面均发挥关键作用^[7,13]。EMT是胚胎发育中形态生发的一个关键过程,指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,主要表现为细胞黏附分子(如E-cadherin)表达减少、细胞角蛋白(keratin)细胞骨架转化为Vimentin为主的细胞骨架等。通过EMT,上皮细胞失去了细胞

极性,失去与基底膜的连接等上皮表型,获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型。在“炎癌转化”过程中,浸润的免疫细胞及分泌的细胞因子、生长因子和蛋白酶等,会重新激活胚胎发育阶段被关闭的一些生物学过程,如EMT^[14]。Ai等^[15]研究发现免疫球蛋白受体pIgR可以作为关键的炎症介导者,通过诱导EMT促进肝炎向肝癌的转化。癌变细胞经过EMT,除细胞特性转变外,更重要的是癌细胞获得了高侵袭能力,使癌细胞转化成恶性程度更高的细胞表型^[16]。对EMT过程关键分子的干预能够明显促进肿瘤细胞凋亡、降低血管生成和抑制肿瘤局部复发与转移^[4,17,18]。

值得注意的是,Vimentin对其他一些典型EMT相关基因的表达有明显的调节作用。例如,collagen mRNAs 稳定是胶原蛋白高表达的关键机制,而Vimentin能够以LARP6(La ribonucleoprotein domain family, member 6)分子依赖性模式结合到I型胶原蛋白collagen $\alpha 1$ (Col1a1)和 $\alpha 2$ (Col1a2)mRNAs 5'端非编码区的茎环结构(5' stem-loop, 5'SL)上调节其稳定性^[19]。Vimentin还能够直接与输出到细胞质的过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR γ)相互作用并调节其稳定,当耗尽细胞内Vimentin时,这些细胞质PPAR γ 会经泛素-蛋白酶体途径降解^[20];PPAR γ 这种细胞质输出行为会降低细胞核内PPAR γ 对靶基因的转录激活能力,而后者一旦被激活,能够抑制TGF- $\beta 1$ 诱导的EMT,抑制Vimentin、Fibronectin(纤连蛋白)等的表达^[21]。而且,Vuoriluoto等^[22]通过实验证明,Vimentin表达对于H-Ras-V12G和Slug诱导的EMT相关迁移是必须的。这说明Vimentin在肿瘤细胞EMT过程中可能具有关键的调控作用。

1.3 Vimentin 可驱动 NLRP3/Caspase-1 炎症信号

NLRP3是启动NLRP3炎性小体形成的主要感受器蛋白。所谓炎性小体(inflammasome)是一类存在于细胞内的多蛋白复合物,是天然免疫系统的重要组成部分。NLRP3炎性小体是迄今发现配体数最多、也是最复杂的一种炎性体,主要是由感受器蛋白NLRP3、衔接分子ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)及效应分子pro-caspase-1组成。当感知到危险信号时,NLRP3招募并裂解pro-caspase-1;活化的Caspase-1进一步促进炎症

介质 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的切割成熟,使之分泌到细胞外发挥各种炎症效应;此外,炎性小体的活化还能够调节 Caspase-1 依赖的细胞焦亡(pyroptosis),诱导细胞在炎性和应激的病理条件下死亡^[23],并参与调节线粒体自噬^[24]。

虽然恰当的炎症反应是机体先天免疫系统为移除有害刺激或病原体、促进损伤修复的有力武器,但长期、过度的炎症反应可以引起自身免疫系统功能失调,反而造成自身组织、细胞损伤。作为炎症反应的中心环节,炎性小体不仅参与多种炎症疾病的免疫应答,更与肿瘤的发生发展密切相关,它通过 NLR 分子/Caspase-1 信号释放大量的 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子,对肿瘤有着促进或抑制的双重作用^[25]。尽管炎性小体在肝癌发生发展中的作用尚存在一定争议,但有研究表明,当肝脏存在炎症时,肝内巨噬细胞^[26]和肝实质细胞^[27]内 NLRP3/Caspase-1 信号均增强;而且在相同条件下,NLRP3/Caspase-1 信号在肝癌细胞内的上调水平要明显高于正常肝细胞^[27]。

2015 年,美国研究人员在《Nature》上发表了他们最新的研究成果,Vimentin 可能是 NLRP3 炎性小体的关键调控因子,它通过与 NLRP3 直接相互作用影响炎性小体的形成与活性,在组织损伤和纤维化过程中发挥重要作用;当体内或体外实验敲除 *Vim* 基因后,均可使 Caspase-1/IL-1 β 信号降低,组织重塑和纤维化等情况得到改善^[28]。

2 Vimentin 在 Caspase 凋亡通路中发挥重要作用

细胞凋亡(apoptosis)是一种由基因调控的细胞主动的、程序化的死亡过程,在机体生长发育、细胞分化和病理状态中发挥重要作用。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteine-containing aspartate-specific proteases, Caspase)是执行细胞凋亡的蛋白质家族,在细胞凋亡过程中具有不可或缺的地位^[29]。目前已经发现 11 种 Caspase,根据其位置及功能的不同, Caspase 家族蛋白酶分为凋亡启动子、凋亡效应子和炎症介导因子三大类,大部分成员是凋亡的启动子或效应子发挥重要作用,如 Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的凋亡效应子之一,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[30]。

大量研究表明,Vimentin 在肿瘤细胞凋亡过程中表达明显下调,其蛋白裂解成不同大小的裂解片段。如 Hashimoto 等^[31]在由紫外线照射人上皮肿瘤细胞引发细胞凋亡的过程研究中发现,Vimentin 裂解成 3 个大小不同的片段。Morishima 等^[32]分别用抗 Fas 抗体、TNF- α 和星形孢菌素处理人的白血病细胞(Jurkat 细胞),裂解产物都产生一致的 4 个大小不同的裂解片段。Belichenko 等^[33]用 Pc4-PDT 处理的 Jurkat 细胞,得到了一致的结果。

综合 Yang^[34]、Schietke 等^[35]、Tzivion 等^[36]等文献分析,下调 Vimentin 可通过以下方式促使肿瘤细胞发生凋亡:①在肿瘤细胞中,p53 蛋白与 Vimentin 形成复合体,Vimentin 抑制 p53 蛋白发挥抗凋亡作用,在破坏 Vimentin 结构的情况下,大量的 p53 蛋白释放入胞浆中活化,并与线粒体直接相连,从而控制细胞凋亡;②Vimentin 在细胞内,可与 14-3-3 调节蛋白结合,14-3-3 蛋白的主要功能是调节信号分子的活性,促进凋亡因子的释放,如 Caspase、Bad 等。当 Vimentin 与 14-3-3 蛋白结合,便使 14-3-3 蛋白失去了释放促细胞凋亡因子的功能,抑制细胞凋亡;当 Vimentin 突变或产生裂解后,则失去了对 14-3-3 蛋白的束缚,导致促细胞凋亡因子 Bad 表达增多,启动细胞程序性死亡。

在细胞凋亡过程中,催化 Vimentin 水解的是 Caspase,其主要裂解位点分别于 N 端的 Asp85 和 Asp259 两个氨基酸位置,在 Asp85 位的裂解导致产生一个 N 端小片段(truncated vimentin 1-85aa, T-vimentin),该片段不能掺入到正常的中间纤维网络,一方面干扰正常波形蛋白组装成中间纤维,另一方面能诱导依赖于 Caspase(尤其是 Caspase 1/8)的细胞凋亡^[37]。Withaferin-A 等抗肿瘤药物在表达 Vimentin 的肿瘤细胞中通过裂解 Vimentin 诱发明显的凋亡反应(这种促凋亡作用在正常的间质细胞中不明显);一旦敲除 *Vim* 基因,或突变 Vimentin 中 Caspase 催化位点(Asp85 和 Asp259),或利用 Caspase 抑制剂阻断 Caspase 诱导的 Vimentin 裂解,均可使 Withaferin-A 诱发的促凋亡反应终止^[4]。本课题组在实验研究过程发现,由黄芪、白术、云苓等组成的健脾益气方^[38]能够通过 Caspase-3 裂解 Vimentin,使其蛋白水平下调;并利用 Caspase-3/Vimentin 裂解片段形成的正反馈促凋亡信号诱导肝癌细胞发生凋亡。

3 结 语

Vimentin 可作为肿瘤治疗新靶点,其可能是联系“炎癌转化”的重要分子,可通过与肝癌致病因子直接相互作用、调控 EMT 过程和抑制 NLRP3/Caspase-1 炎症信号而在肝癌发生发展过程中发挥重要作用。此外,Vimentin 还可参与 Caspase 介导的肝癌细胞凋亡。正如 Lahat 等^[4]所说“评估 Withaferin-A 或其类似物,及其他抗 Vimentin 疗法在具有 EMT 特征肿瘤中的作用,都是值得关注的”。

参考文献:

- [1] Kokkinos MI,Wafai R,Wong MK,et al. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo[J]. Cells Tissues Organs, 2007,185(1-3):191-203.
- [2] Satelli A,Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. Cell Mol Life Sci, 2011,68(18):3033-3046.
- [3] Prasad SC,Thraves PJ,Kuettel MR,et al. Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human prostate epithelial tumor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun,1998,249(2):332-338.
- [4] Lahat G,Zhu QS,Huang KL,et al. Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target;insights from in vitro and in vivo mice xenograft studies[J]. PLoS One ,2010,5(4): e10105.
- [5] Chen WQ,Zheng RS,Zhang SW,et al. Report of cancer incidence and mortality in China,2012[J]. China Cancer, 2016,25(1):1-8. [陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2016,25(1):1-8.]
- [6] Berasain C,Castillo J,Perugorria MJ,et al. Inflammation and liver cancer:new molecular links[J]. Ann N Y Acad Sci,2009,1155:206-221.
- [7] Arzumanyan A,Reis HM,Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Cancer,2013,13(2):123-135.
- [8] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [9] Kang SM,Shin MJ,Kim JH,et al. Proteomic profiling of cellular proteins interacting with the hepatitis C virus core protein[J]. Proteomics,2005,5(8):2227-2237.
- [10] Nitahara-Kasahara Y,Fukasawa M,Shinkai-Ouchi F,et al. Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells[J]. Virology,2009,383(2): 319-327.
- [11] Liu D,Wu J,Liu M,et al. Downregulation of miRNA-30c and miR-203a is associated with hepatitis C virus core protein-induced epithelial-mesenchymal transition in normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun,2015,464(4):1215-1221.
- [12] Hu W,Fang ZQ,Liang C,et al. Role of vimentin in hepatocarcinoma cells proliferation investigated by RNA interference and regulations by traditional Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2011,17(20):149-153. [胡卫,方肇勤,梁超,等. RNA 干扰波形蛋白在肝癌细胞增殖中的作用及不同中医治法的调节[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):149-153.]
- [13] van Zijl F,Zulehner G,Petz M,et al. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Future Oncol,2009,5(8):1169-1179.
- [14] Fuxe J,Karlsson MC. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition;a link between cancer and inflammation[J]. Semin Cancer Biol,2012,22(5-6):455-461.
- [15] Ai J,Tang Q,Wu Y,et al. The role of polymeric immunoglobulin receptor in inflammation-induced tumor metastasis of human hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst,2011,103(22):1696-1712.
- [16] Kalluri R,Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest,2009,119(6):1420-1428.
- [17] Grände M,Franzen A,Karlsson JO,et al. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes[J]. J Cell Sci,2002,115(Pt 22):4227-4236.
- [18] Wu KJ,Zeng J,Zhu GD,et al. Silibinin inhibits prostate cancer invasion,motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009,30(8):1162-1168.
- [19] Challa AA,Stefanovic B. A novel role of vimentin filaments;binding and stabilization of collagen mRNAs [J]. Mol Cell Biol,2011,31(18):3773-3789.
- [20] Tsai YC,Tsai SH,Chang EY,et al. Cytoskeletal protein vimentin interacts with and regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma via a proteasomal degradation process[J]. J Cell Biochem,2013,114(7):1559-1567.

- [21] Reka AK, Kurapati H, Narala VR, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(12):3221–3232.
- [22] Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2011, 30(12):1436–1448.
- [23] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. *Nature*, 2012, 481(7381):278–286.
- [24] Yu J, Nagasu H, Murakami T, et al. Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111(43):15514–15519.
- [25] Kolb R, Liu GH, Janowski AM, et al. Inflammasomes in cancer: a double-edged sword[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(1):12–20.
- [26] Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, et al. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(4):e1003330.
- [27] Liu Q. Preliminary study the expression and mechanism of NLRP3 inflammsome in hepatocytes[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2014.22–42. [刘钱. NLRP3炎症体在肝细胞内表达和功能的初步研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.22–42.]
- [28] dos Santos G, Rogel MR, Baker MA, et al. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:6574–6600.
- [29] Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(11):719–727.
- [30] Joseph EK, Levine JD. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(11):2896–2902.
- [31] Hashimoto M, Inoue S, Ogawa S, et al. Rapid fragmentation of vimentin in human skin fibroblasts exposed to tamoxifen: a possible involvement of caspase-3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247(2):401–406.
- [32] Morishima N. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action[J]. *Genes Cells*, 1999, 4(7):401–414.
- [33] Belichenko I, Morishima N, Separovic D. Caspase-resistant vimentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in Jurkat cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 390(1):57–63.
- [34] Yang X. Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Am Pathol*, 2005, 167(3):705–719.
- [35] Schietke R, Brohl D, Wedig T, et al. Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis[J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 85(1):1–10.
- [36] Tzivion G, Luo ZJ, Avruch J. Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(38):29772–29778.
- [37] Byun Y, Chen F, Chang R, et al. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(5):443–450.
- [38] Xie JL, Zhuo SY. Effects of medicated serum containing Jianpi Yiqi decoction on proliferation and invasion of hepatic carcinoma cells SMMC-7721[J]. *Guangxi Journal of Tradition Chinese Medicine*, 2016, 39(1):62–65. [谢金玲, 卓少元. 健脾益气方含药血清对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖与侵袭能力的影响 [J]. 广西中医药, 2016, 39(1):62–65.]